

[Back to list](#)1-1/1 [Next page](#) From 1 - 1 Count

Display format ----- Select the Type of Output -----

[Display checked documents](#) Check All Uncheck All

Result [P] Format(P801) 2006.05.19 1/ 1

C

Application No./Date: 1983-165066[1983/ 9/ 9]
 Public Disclosure No./Date: 1985- 58074 [Translate](#) [1985/ 4/ 4]
 Registration No./Date: 1575625[1990/ 8/24]
 Examined Publication Date (present law): []
 Examined Publication No./Date (old law): 1989- 56756 [Translate](#) [1989/12/ 1]

PCT Application No.: []
 PCT Publication No./Date: []

Preliminary Examination: () [] ()
 Priority Country/Date/No.: () [] ()

Domestic Priority: [] ()
 Date of Request for Examination: [1988/ 7/12]

Accelerated Examination: ()
 Kind of Application: (0000)

Critical Date of Publication: [1983/ 9/ 9] ()
 No. of Claims: (1)

Applicant: UDAKA JUZO

Inventor: UDAKA JUZO, TSUKAGOSHI NORIHIRO, YAMAGATA HIDEO

IPC: C12N 15/00 C12N 1/20 (C12N 15/00)

C12R 1:08) (C12N 1/20 C12R 1:08)

FI: C12N 15/00 A C12R 1:08 C12N 1/20 G

C12N 15/00 C12N 15/00 C12N 1/20 C12N 1/20

F-Term: 4B024KA20, KD06, KD07, KE04, KF12, 4B065AA15X, AA18Y, AB01, AC10, AC14, AC15, BA0

2, BD32, CA32, 4B024AA20, BA13, CA01, DA07, EA04, FA13, GA11

Expanded Classification: 145, 141

Fixed Keyword:

Citation:

[19,1989. 1.31,04] (04,JP,Unexamined Patent Publication,1981015300)

[19,1989. 1.31,04] (04,JP,Unexamined Patent Publication,1982132895)

Title of Invention: PLASMID AND TRANSFORMATION OF BACILLUS BREVIS USING IT

Abstract: NEW MATERIAL: A plasmid having at least a drive unit range of plasmid pUB 110, and contained in the cell of *Bacillus brevis*. USE: A transforming agent for *Bacillus brevis*. Since *Bacillus brevis* has low protease activity, formed protein is not decomposed. PREPARATION: For example, plasmid PHC7 9 and plasmid pUB110 are linked at EcoR I site, a gene having erythromycin resistance derived from plasmid pHW1 obtained by scissoring at Hind III and Cla I is inserted into it, to give shuttle vector pEB3. BamH I fragment of 0.9kb is removed from this plasmid pEB3, to give plasmid pHT-1. COPYRIGHT: (C)1985, JPO&Japio

 Check All Uncheck All[Display checked documents](#)

Display format ----- Select the Type of Output -----

1-1/1 [Next page](#) From 1 - 1 Count[Back to list](#)

BEST AVAILABLE COPY

2006/05/19

(1)

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 昭60-58074

⑫ Int.Cl.

C 12 N 15/00
 C 07 H 21/04
 //C 12 N 15/00
 C 12 R 1:08

識別記号

府内整理番号

⑬ 公開 昭和60年(1985)4月4日

7115-4B
 7252-4C

審査請求 未請求 発明の数 2 (全7頁)

⑭ 発明の名称 プラスミドおよびそれを用いてバチルス・ブレビスを形質転換する方法

⑮ 特願 昭58-165066

⑯ 出願 昭58(1983)9月9日

特許法第30条第1項適用 昭和58年3月10日 社団法人日本農芸化学会発行の日本農芸化学会昭和58年度大会講演要旨集において発表

⑰ 発明者 鵜高重三	名古屋市名東区植園町1-24-3
⑰ 発明者 塚越規弘	名古屋市名東区猪高町大字猪子占字社口9-391
⑰ 発明者 山形秀夫	名古屋市天白区天白町大字平針字黒石2845-256
⑰ 出願人 鵜高重三	名古屋市名東区植園町1-24-3
⑰ 代理人 井理士 久保田 藤郎	

明細書

1. 発明の名称

プラスミドおよびそれを用いてバチルス・ブレビスを形質転換する方法

2. 特許請求の範囲

1. プラスミド pUB110 のドライブユニット領域を少なくとも有し、バチルス・ブレビスの細胞内に含まれているプラスミド。
2. バチルス・ブレビスの細胞内にプラスミド pUB110 のドライブユニット領域を少なくとも有するプラスミドを導入することを特徴とするバチルス・ブレビスの形質転換方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はプラスミドおよびそれを用いてバチルス・ブレビスを形質転換する方法に関する。

バチルス・ブレビス (Bacillus brevis) は表面蛋白質を細胞外に多量に蓄積し、またプロテアーゼ活性が少ない。

本発明者らは、バチルス・ブレビスのこのよう

な性質に着目し、本菌は組換えDNAの受容菌として好適なものであると考えた。

しかるに、これまでにバチルス・ブレビスにおいてはコピー数の多いプラスミドは見出されていない。このような事情のため、バチルス・ブレビスのDNA受容菌としてすぐれた性質は利用されていなかつた。

そこで、バチルス・ブレビス細胞内でよく増殖できるプラスミドベクターの開発が強く要望されている。

本発明者らは、スタフィロコッカス・アウレウス由来のプラスミドであつてバチルス・ズブチリスを宿主とするベクターとして広く使用されている pUB110 (Oryzaan, T. J., S. Contento and D. Dubman (1978) J. Bacteriol. 134, 318-329) に注目し、このプラスミドベクター pUB110 を用いてバチルス・ブレビスを形質転換したところ、pUB110 はバチルス・ブレビス細胞内で極めてよく増殖することならびに既プラスミド pUB110 に外来遺伝子を挿入し、このプラスミドを用いて

バチルス・ブレビスを形質転換せしめたところ、この外来遺伝子の情報を効率よく発現することを見出した。

本発明は第1にプラスミドpUB110のドライブユニット領域を少なくとも有するプラスミドであつてバチルス・ブレビスの細胞内に含まれているプラスミドを提供するものであり、第2にバチルス・ブレビスの細胞内にプラスミドpUB110のドライブユニット領域を少なくとも有するプラスミドを導入することを特徴とするバチルス・ブレビスの形質転換方法を提供するものである。

ここで、ドライブユニット領域とはori領域と同義であり、宿主細胞内でプラスミドが増殖しうる機能を司るDNA領域を意味する。本発明のプラスミドpUB110のドライブユニット領域を少なくとも有するプラスミドとしてドライブユニット領域のはかに薬剤耐性などの宿主細胞内に導入されたときに、その宿主を形質転換して当該プラスミドが導入されていない宿主と区別出来るようにするための、いわゆるマーカー遺伝子が含まれ

ているものを用いることが望ましい。さらに、プロモーター配列を入れておくこともでき、そのほか発現させるべき蛋白質をコードする遺伝子、蛋白質を細胞外に分泌せしめるに必要なCDSなどが挿入されていてもよい。すなわち、これらマーカー遺伝子、プロモーター配列、外来遺伝子および/または蛋白質分泌のためのCDSが挿入されているプラスミドのいずれも本発明におけるプラスミドに含まれるものである。

本発明のpUB110由来の新しいプラスミドは具体的には次のようなものがある。すなわち、第1図に制限酵素切断地図を示したプラスミドpEB-2はpUB110とpBR322を結合したものであり、大腸菌(*E. coli*)とバチルス・ブレビス(*Bacillus brevis*)ICにおけるシナトルベクターであり、いずれの細菌においてもコピー数が多いという特色がある。図中、*Amp*^Rはアンピシリン耐性、*Tet*^Rはテトラサイクリン耐性、*Nm*^Rはネオマイシン耐性を示す。第2図に、本発明の新しいプラスミドであるpEB-3およびpHT-1の制限酵

素切断地図およびその造成経過を示す。pHT-1はpUB110と同様にバチルス・ブレビスでコピー数の多いプラスミドであり、ネオマイシン耐性遺伝子(*Nm*^R)のはかにエリスロマイシン耐性遺伝子(*erm*^R)を含んでいる。さらに、pUB110 DNAに存在した制限酵素切断部位以外にHind IIIにより1個所切断される部位をもつている。また、pUB110とα-アミラーゼを結合させて得たプラスミドpBAM-102の制限酵素切断地図を第3図に示す。

上記各プラスミドを導入した大腸菌およびバチルス・ブレビスはいずれも微生物研究所に寄託されており、前株名と寄託番号は以下の通りである。

<i>Escherichia coli</i>	HB101/pEB-2	FERM P-7227
"	HB101/pEB-3	FERM P-7228
<i>Bacillus brevis</i>	47/pHT-1	FERM P-7226
"	47/pBAM-102	FERM P-7225

本発明において宿主として用いるバチルス・ブレビスにはたとえばバチルス・ブレビス47のはかバチルス・ブレビス481, 144, 899など

がある。また、プラスミドベクターの例としては上記した4種類のプラスミドがある。

バチルス・ブレビスを形質転換する方法としては以下のような方法がある。

高渗透圧液(高張溶液とも云う。)に浮遊した細胞にリソチームを作用させて生じたプロトプラスト(細胞壁を失なつた裸の細胞)ICポリエチレングリコールを用いてプラスミドDNAを導入する方法や後述するように、アルカリ性トリス塩酸緩衝液による処理で表面蛋白質を除去した細胞(細胞壁の蛋白質のみを失なつた細胞)にポリエチレングリコールを用いてプラスミドDNAを導入する方法がある。

本発明のプラスミドを用いることによってバチルス・ブレビスを容易に形質転換することができる。このバチルス・ブレビスは蛋白質を細胞外に多量に生産する能力を有しており、しかもプロテアーゼ活性がないので、生成した蛋白質が分解されない。したがつて、動物、植物および微生物由來の遺伝子を組込んだ場合、その遺伝子の有する

遺伝情報は高い効率で発現され、かつ生成した蛋白質は分解されず菌体外に分泌される。なお、本発明のプラスミドを組込んで形質転換したバチルス・ブレビスの培養は通常のバチルス・ブレビスの培養と同じ方法で行なえばよい。

次に、本発明を実施例により説明する。

実施例 1

第2図に示したように、プラスミド pHO 79 (Hohn, B. and Collins, J. (1980) Gene 11, 291-298) とプラスミド pUB 110 (Gryczan, T. J., S. Contente and D. Dubnan (1978) J. Bacteriol. 134, 318-329) とを EcoRI 部位で結合したものを HindIII, ClaI で切断し、これに HindIII, ClaI で切断して得たプラスミド pHW1 (Horinouchi, S. and B. Weisblum (1982) J. Bacteriol. 150, 804-814) 由来のエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入することによってシヤトルベクター pEB3を得た。

次いで、このプラスミド pEB3 から 0.9 kb の BamHI 断片を除去することによりプラスミド pHT

-1を得た。

実施例 2

プラスミド pBR 322 とプラスミド pUB 110 を用い、実施例 1 と同様にしてこれらを EcoRI 部位で結合することにより、第1図に示したプラスミド pEB2を得た。

実施例 3

(1) 好熱性 α -アミラーゼ遺伝子の分離

バチルス・ステアロサーモフィラス (*B. stearothermophilus*) DY-5 の好熱性 α -アミラーゼ遺伝子を含むプラスミド pHI 501 より α -アミラーゼ遺伝子を以下のようにして調製した。

プラスミド pHI 501 (特願昭 58-50148 号 明細書参照) を制限酵素 EcoRI で部分的に加水分解後、再び BamHI で部分的に加水分解し、種々の長さの DNA を調製し、これを α -アミラーゼ遺伝子として用いた。

(2) バチルス・ズブチリスとバチルス・ブレビス 47への好熱性 α -アミラーゼ遺伝子のクローニング

図である。

上記 α -アミラーゼ遺伝子の入ったプラスミドを有する枯草菌よりプラスミドを Birnboim, H. C. and Daly, J. の方法 (Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523 (1979)) により抽出し、セシウムクロライド-エチジウムプロマイド超速心分離法でさらにプラスミド DNA を精製したのちバチルス・ブレビス 47 菌の形質転換に使用した。

まずはじめにアルカリ性トリス塩酸緩衝液による処理によつてバチルス・ブレビスの表面蛋白質を除去し、残されたペプチドグリカン層と細胞質膜によつてのみ囲まれた細胞にポリエチレングリコールを用いてプラスミド DNA を導入した。すなわち、T₆ 培地に前培養したバチルス・ブレビスの菌液を新しい T₆ 培地 5 ml に 100 分の 1 倍釀し、37°C で振とう培養を行ない、対数増殖後期 (O.D. 660 nm = 1.9) に達したとき、菌体を遠心 (5000 g, 5 分, 室温) によつて集め、50 mM のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 5 ml により洗浄した後、50 mM のトリス塩酸緩衝液 (pH 8.5)

ベクター・プラスミドとして pUB 110 を用いた。まず、プラスミド pUB 100 を制限酵素 EcoRI および BamHI で切断し、5' 末端のリン酸基をバクテリアル・アルカリ・ホスファターゼ処理により除去し、線状プラスミド pUB 110 を調製した。

前記好熱性アミラーゼ DNA と線状プラスミド pUB 110 を混合し、T₆ DNA リガーゼで両 DNA を連結した。

連結した DNA を枯草菌 (*B. subtilis*) 1A 289 (α -アミラーゼ陰性株) に Chang, S. and Cohen, S. N. のプロトプラス法 (Mol. Gen. Genet. 168, 111-115 (1979)) で形質転換し、カナマイシン耐性により多數の形質転換株を得た。これらの形質転換株を 1% 可溶性デンプンと 10 μg/ml カナマイシンを含む Difco Antibiotic medium 5 プレート上にレブリカし、1 夜培養後、ヨードデンプン反応によりコロニーの周辺が無色になっているものを検索することによつて α -アミラーゼ生産株を選択した。第3図は α -アミラーゼ遺伝子の入ったプラスミド pBAM-102 の制限酵素切断地

IC 廉崩し、37°Cで振とうした。60分後、菌体を遠心(3000g, 5分, 室温)によつて集め、0.5mlのT₂培地(0.953% KH₂PO₄, 0.426% Na₂HPO₄, 0.5% 肉エキス, 1% ポリペプトン, 0.2% 酵母エキス, 1% グルコース)に懸滴した。これにプラスミド pBAM 溶液(10mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.5, 1mM EDTA)と T₂ 培地の1:1混合液100μlを加えて混合した。次いで、直ちに4.0% ポリエチレングリコール溶液(0.953% KH₂PO₄, 0.426% Na₂HPO₄, 4.0% (w/v) ポリエチレングリコール PEG 6000) 1.5mlを加えて攪拌し、37°Cで10分間振とうした。しかる後、遠心(3000g, 5分, 室温)により菌体を集め、2.0 mM MgCl₂を添加したT₂培地に懸滴した。37°Cで150分間振とうした後、形質転換体選択用の寒天培地(60μg/mlのネオマイシンを含むT₂培地プレート(ポリペプトン1%, 肉エキス0.5%, 酵母エキス0.5%, 酵母エキス0.2%, グルコース1%, ウラシル0.01%, pH 7))に0.1mlずつ散布した。37°Cで50時間培養し

てネオマイシン耐性株を得た。これらの形質転換株を1%可溶性デンプンと60μg/mlネオマイシンを含むT₂培地プレート上にレブリカし、1夜培養後、ヨードデンプン反応によりコロニー周辺が無色になつたものを検索することによつてα-アミラーゼ生産株(バチルス・プレビス 47/pBAM-102 (ZBEM P-7225))を選択した。

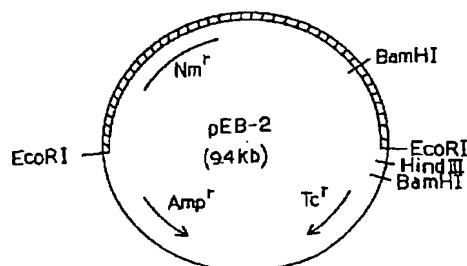
(3) α-アミラーゼの生産性

第3図に示すプラスミドを有する枯草菌ならびにバチルス・プレビス 47 菌を60μg/ml ネオマイシンまたは10μg/ml カナマイシンを含むT₂液体培地に接種し、37°Cで22時間培養し、遠心分離により培養液を調製して培養液中のα-アミラーゼ活性を不破の方法(J. Biochem. 41, 583-603 (1954))により40°Cで測定した。結果を第1表に示す。

第1表

宿主	α-アミラーゼ活性(単位/ml)	
	T ₂ 培地 + 10μg/ml カナマイシン	T ₂ 培地 + 60μg/ml ネオマイシン
枯草菌 IA 289	76	375
バチルス・プレビス 47 菌	530	3600

第1図



枯草菌およびバチルス・プレビス 47 菌で作られるα-アミラーゼはすべて菌体外に分泌され、耐熱性を示した。第1表に示したように、α-アミラーゼ遺伝子を含む同じプラスミドの存在によつてバチルス・プレビス 47 菌を宿主とした場合には、枯草菌におけるよりも約10倍に及ぶ多数のα-アミラーゼが生産された。

4. 図面の簡単な説明

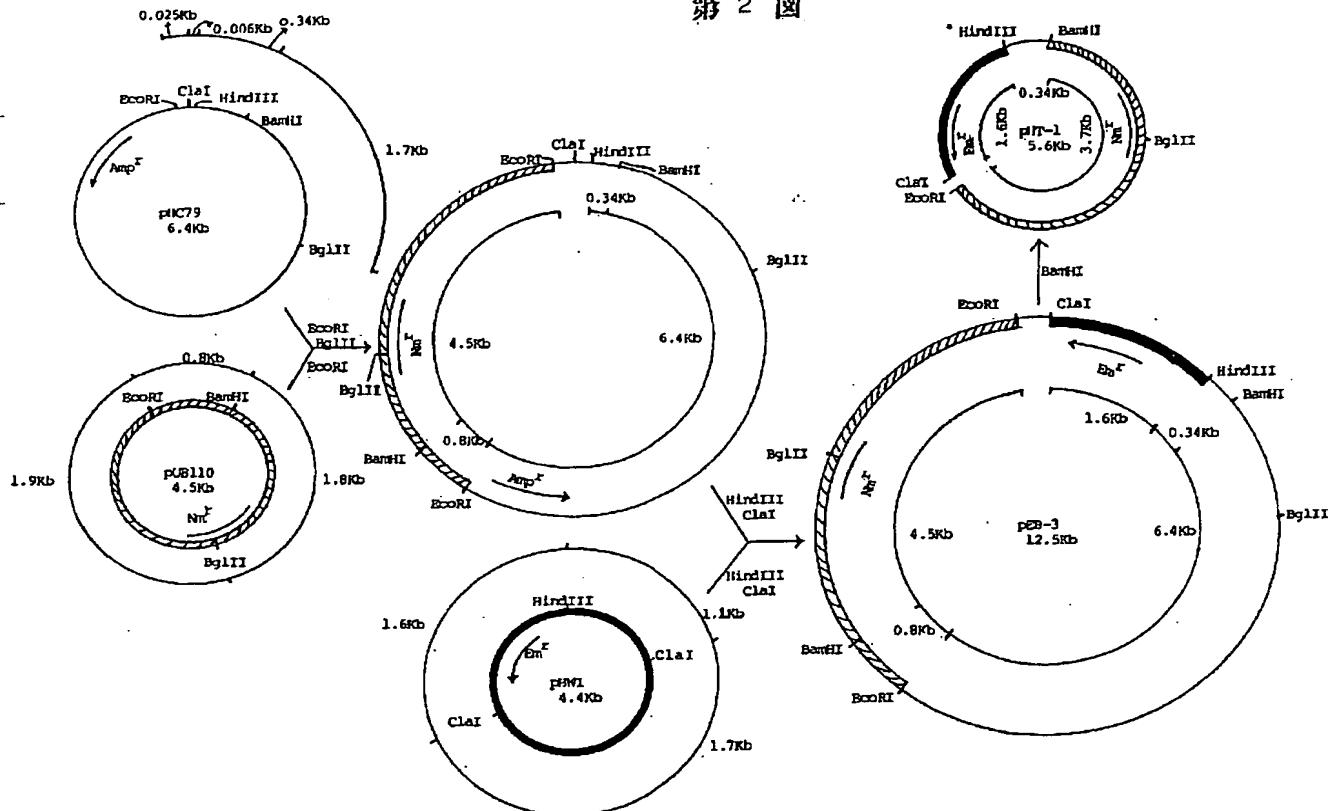
第1図は本発明のプラスミド pEB-2 の制限酵素切断地図、第2図は本発明のプラスミド pEB-3 および pHE-1 の制限酵素切断地図およびこれらプラスミドの造成経過を示すものである。第3図は本発明のプラスミド pBAM-102 の制限酵素切断地図である。

特許出願人 高 重 三

代理人弁理士 久保田 蔭 郎



第2図



第3図

手続補正書(自発)

昭和58年10月6日

特許庁長官 若杉和夫 殿

1. 事件の表示

特願昭58-165066

2. 発明の名称

プラスミドおよびそれを用いてバチルス・ブレビスを形質転換する方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

鶴高重三

4. 代理人

平104

東京都中央区京橋1丁目1番10号

西勘ビル5階

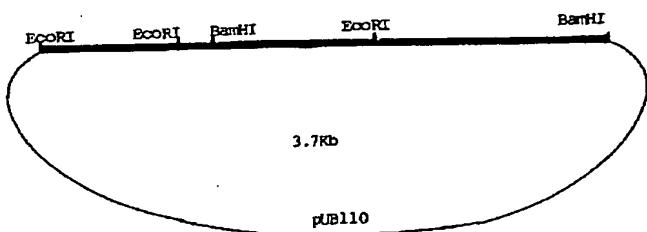
(7407)弁理士 久保田藤郎

電話(275)0721番



5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄および図面

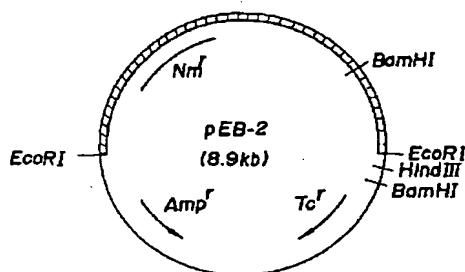


6. 補正の内容

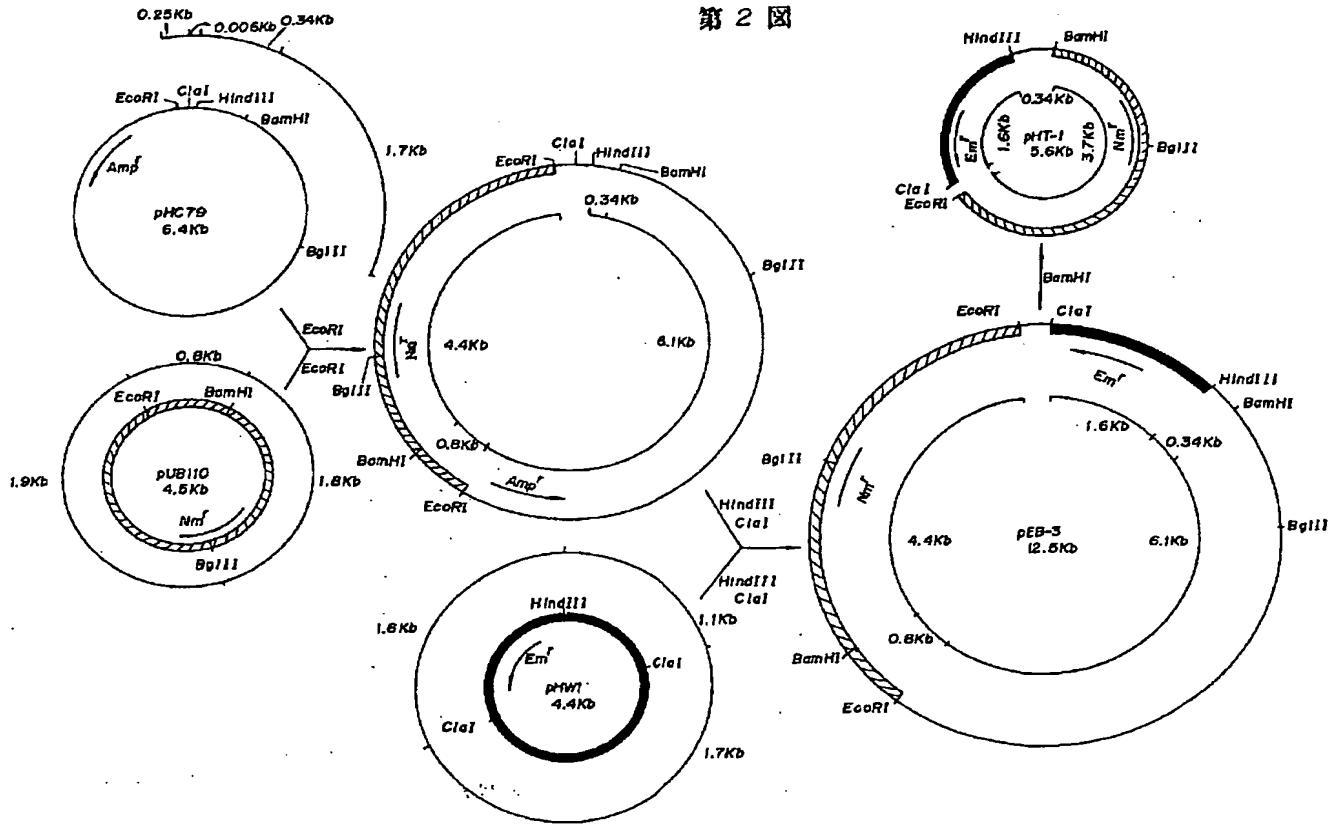
- (1) 明細書第2頁下から6行目の「Dubman」を「Dubnau」に訂正する。
- (2) 同第7頁11行目の「D. Dubnan」を「D. Dubnau」に訂正する。
- (3) 同第7頁下から2行目の「0.9 kb」を「6.9 kb」に訂正する。
- (4) 第1図～第3図を別紙の通りに訂正する。

(以上)

第1図



第2図



第3図

